

令和 7 年 5 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K07293

研究課題名（和文）CASK遺伝子モザイク欠損が小脳低形成を引き起こす神経回路メカニズムの解明

研究課題名（英文）Studies on circuit-mechanisms of cerebellar hypoplasia by mosaic distribution of CASK deficient neurons.

研究代表者

森 琢磨（Mori, Takuma）

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70545798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：CASK異常症女性患者のモデルとして、ヘテロ接合Caskノックアウトメスマウスの脳組織を解析した。X染色体の不活性化を可視化することを目的として、HPRT1-GFPノックインマウスを組み合わせることで、脳内の細胞モザイク分布様式を可視化することに成功した。ヘテロ接合Caskノックアウトメスマウスは小脳サイズの低下が顕著であり、かつ、運動学習などの小脳が関与する運動機能の低下が観察された。可視化されたCask非発現顆粒細胞が生後1から2週のマウスで観察されたことから、この小脳サイズの低下は、この時期に起きる小脳顆粒細胞死に起因する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでX連鎖性発達性疾患の研究は、男性/オスを対象として研究が発展してきた。これは、女性特有のX染色体不活性化という生物現象が、複雑な組織構造を形成するため、その解析が困難だったという理由が大きい。本研究では、蛍光タンパク質による細胞の可視化を利用することで、この技術的な困難を克服し、脳組織構造を遺伝子情報も組み込んだ形で解析することが可能になった。この研究は、CASK異常症という希少疾患の発症メカニズムの理解や治療戦略の策定に役立つことは疑いない。加えて、本研究手法は、他のX連鎖性発達性疾患の研究にも応用可能であり、その波及効果は大きく社会的に意義ある成果に繋がったと言える。

研究成果の概要（英文）：As a model for female patients with CASK abnormalities, we analyzed brain tissue from heterozygous Cask knockout female mice. To visualize X chromosome inactivation, we combined HPRT1-GFP knock-in mice, successfully visualizing the cellular mosaic distribution pattern within the brain. Heterozygous Cask knockout female mice exhibited a significant reduction in cerebellar size and impaired motor functions such as motor learning, which are associated with cerebellar function. The visualization of Cask-non-expressing granule cells in mice aged 1 to 2 weeks suggested that the reduction in cerebellar size may be attributed to cerebellar granule cell death occurring during this period.

研究分野：神経科学

キーワード：X染色体不活性化 CASK異常症 小脳低形成

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MICPCH(Microcephaly with Pontine and Cerebellar Hypoplasia) 症候群は、小脳、脳幹の低形成を特徴とする X 連鎖性精神遅滞症候群で、點頭てんかんなどを合併することが知られている。患者のほとんどが女性である本症候群においては、X 染色体上の CASK が唯一の原因遺伝子であり(Najm et al. Nature Genet. 2008)、CASK の機能不全が本症候群の症状を引き起こす原因となっていると考えられる。申請者はメスの CASK ヘテロノックアウトマウスを用いて CASK の機能欠損が中枢神経系のシナプス機能に及ぼす影響について研究してきた経験から、このメスの CASK ヘテロ欠損メスマウスは、患者のほとんどが女性である MICPCH 症候群の遺伝的バックグラウンドを再現したモデルであると考えている。

X 染色体上の CASK 遺伝子発現は X 染色体不活性化 (XCI) によって調節される。女性特有の遺伝子発現メカニズムである XCI は、変異遺伝子をもつ X 染色体が不活性化された CASK 発現細胞と正常な X 染色体が不活性化された欠損細胞を生み出すと予想された。その予想を実験的に検証したところ、CASK ヘテロ欠損メスマウスの大脳新皮質では CASK 発現細胞と欠損細胞が約 50% ずつ分布することが single cell RT-PCR 法により確認できた。そして CASK は Guanylate Kinase ドメインを介して転写因子 TBR1 に結合することで NMDA 受容体 2B 遺伝子発現を制御しており、CASK 欠損細胞ではこのメカニズムの破綻により興奮性・抑制性シナプス機能のバランス異常が起きていることを明らかにした (Mori et al. Molecular Psychiatry, 2019)。これらの研究成果は、CASK 欠損によって起こるシナプス異常のメカニズムの解明につながるものだが、MICPCH 症候群の病態メカニズムを解明するためには、機能的神経回路の異常など、まだまだ研究しなければならない問題が残されていた。

女性患者が圧倒的多数である MICPCH 症候群の主要症状は、小脳および脳幹の低形成であり、その運動障害は患者の QOL に大きく影響している。NMDA 受容体 2B サブユニットの発現低下モデルマウスでは小脳低形成が確認されないことから、MICPCH 症候群における小脳低形成には、申請者が報告した大脳新皮質における病態メカニズムとは異なる CASK 機能が関与していると考えられた。さらに、CASK 発現細胞と CASK 欠損細胞が確率的に生み出される CASK ヘテロ欠損メスマウスにおいて、CASK 欠損細胞だけが変性する細胞自律的なメカニズムによって小脳低形成が起きるのか？それとも CASK 発現細胞も巻き込んだ非細胞自律的な現象によって小脳の発達に阻害されるのか？という、ヘテロな細胞集団をもつ女性特有の発症メカニズムは未解決である。

本研究計画は以下に示す問いを立て、それに答えることでこの難病の理解と治療を目指した。

1. CASK機能喪失により細胞生存や機能形態に異常が見られる小脳細胞タイプはなにか
2. CASK機能喪失による小脳内および小脳に関連する神経回路の異常はなにか

これらの問いに対して、小脳細胞タイプと CASK 発現細胞と欠損細胞を unbiased かつ網羅的に解析することで、MICPCH 症候群の発症メカニズムの理解が進むことを期待した。

2. 研究の目的

本研究はこれらの問いに答えるために、CASK ヘテロ欠損メスマウスを用いて、X 染色体不活性化によるモザイク状の CASK 欠損が、小脳神経細胞の生存および小脳神経回路形成に及ぼす影響を電気生理学的・解剖学的に解析する。X 染色体不活性化による細胞のモザイク分布を解析するために、これまで申請者は single cell RT-PCR 法を用いてパッチクランプ記録された細胞 1 つ 1 つの遺伝型を決定してきた。本研究では、小林慎博士が開発した X 染色体に GFP や RFP 遺伝子をもつ HPRT-GFP/RFP マウス(Kobayashi et al. Development, 2017)と CASK ヘテロ欠損メスマウスを組み合わせることで、CASK 遺伝子の X 染色体不活性化状態を網羅的に可視化し unbiased に解析することを本研究の達成すべき主目標として設定した。

3. 研究の方法

本研究計画を始めるにあたり、臨床報告の実験的な検証を実施した。ヒト臨床報告では、表現型から遺伝子変異をあきらかにするいわゆる遺伝学研究である。小脳低形成を示す患者の多くから CASK 遺伝子の変異が同定されているが、実際に CASK の遺伝子変異が小脳神経細胞に影響を与えるのかは不明のままであった。そこで、小脳神経細胞の発達にともなう変化とその分子メカニズムを解析するために、小脳顆粒細胞の初代培養系を構築した。この手法により、小脳顆粒細胞から CASK 遺伝子をノックアウトしたことによる影響と、ウイルスベクターを用いて CASK 遺伝子を外来補充することによる治療効果を実験的に検証した。

CASK ヘテロ欠損メスマウスにおける X 染色体不活性化様式がシナプス伝達に与える影響を解析するためには、X 染色体不活性化様式を可視化する必要がある。X 染色体上の遺伝子 Hprt 領域に GFP を挿入された HPRT-GFP オスマウスを CASK ヘテロ欠損メスマウスと交配する。その結果生まれた CASK ヘテロ欠損メス (HPRT-CASK KO マウス) では、GFP をもつ父由来染色体は CASK 野生型であり、GFP をもたない母由来染色体は CASK 欠損型となる。

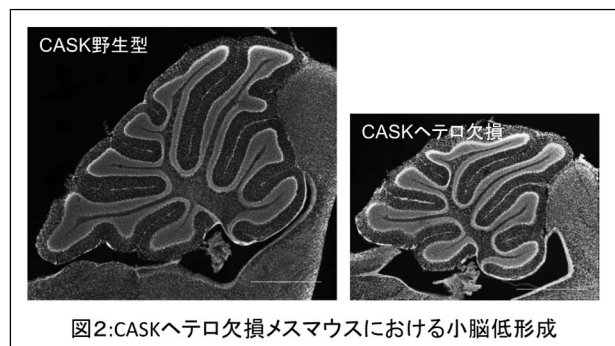
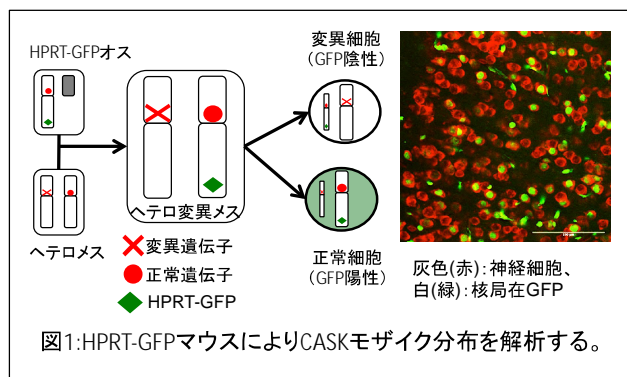
これにより、GFP 発現細胞は CASK 発現細胞、GFP 陰性細胞は CASK 欠損細胞であると同定できる (図 1)。

これまでに実施した予備実験の結果、CASK ヘテロ欠損メスマウスでは小脳低形成、そして小脳を構成する顆粒細胞およびプルキンエ細胞密度が減少していることが明らかになっている (図 2)。申請者はこれらの予備実験を基に、CASK 遺伝子発現が顆粒細胞およびプルキンエ細胞の生存に関わっている可能性を着想した。もし、小脳細胞の生存が CASK 依存的であるならば、X 染色体不活性化の影響により CASK 欠損細胞だけが細胞死を起こすと予想される。この仮説を実験的に検証するために、HPRT-CASK KO マウス脳組織切片における GFP 陽性率を小脳タイプごとに解析する。すでに述べたように、GFP 発現は CASK 遺伝子発現を示している。分子マーカーを用いて免疫組織化学法により可視化されたそれぞれの小脳細胞タイプの GFP 陽性率を算出し、その陽性率を発達段階ごとに解析する。これにより CASK 遺伝子発現が小脳細胞タイプの生存に与える影響を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

1: 小脳顆粒細胞のアポトーシスに関わる CASK 機能ドメインの同定

本計画では最初に、CASK 遺伝子異常が実際にどのような生物学的現象を介して小脳の萎縮を引き起こしているのかということを検討した。初めに、幼若期マウスの小脳組織標本を解析したところ、小脳顆粒細胞の細胞密度が生後 1 から 2 週齢で低下していることが明らかになった。また、同時期には小脳顆粒細胞層の発達が遅延することも同時に明らかになった。これらのことから、小脳の顆粒細胞が生後 2 週齢に死亡していると仮定し、小脳顆粒細胞の培養系を確立し、その変化を観察した。Cre リコンビナーゼ依存的に CASK 遺伝子をノックアウトできる flox マウスを用いて小脳顆粒細胞の培養細胞を作成し、Cre リコンビナーゼを発現するレンチウイルスを接種したところ、顆粒細胞が CASK 依存的にアポトーシスすることを見出した。このアポトーシス



は CASK 遺伝子の外来的な補完によって抑制できたが、CASK の CaMK ドメイン、PDZ ドメイン、SH3 ドメインのいずれかが欠損していると抑制されなかったことから、これらの機能ドメインが小脳顆粒細胞のアポトーシスに関与している可能性が示唆された（論文 2 で発表）。

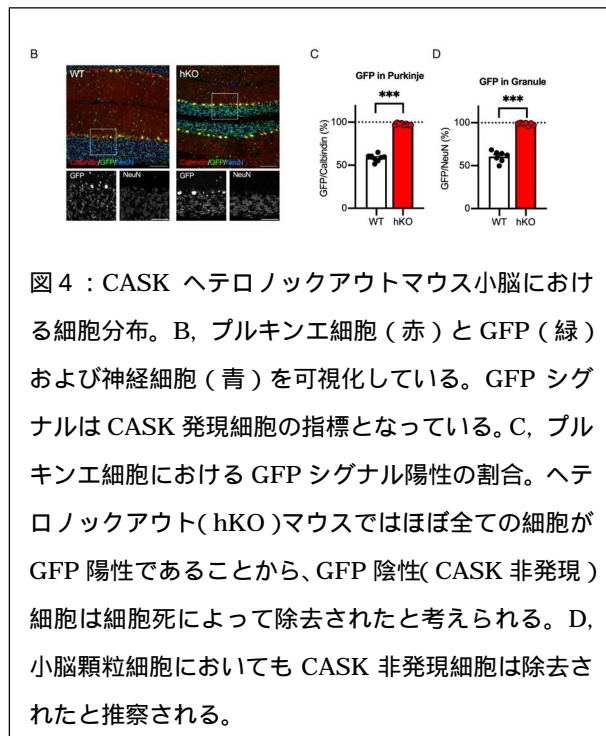
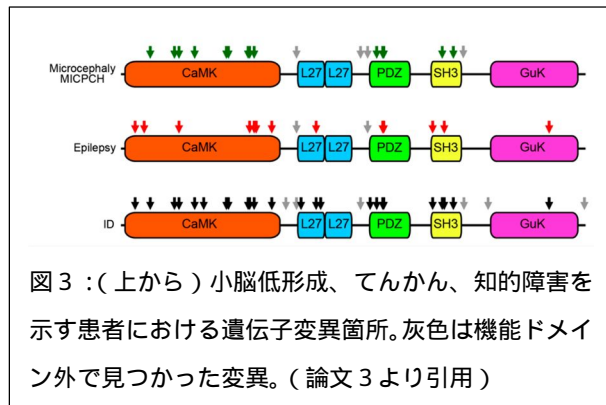
実験から得られた結果が、臨床症例報告と一致するのをおきらかにするために、これまでに報告されている臨床報告をまとめ上げた。とくに、CASK の遺伝子変異が位置する機能ドメインと病態の変化を解析したところ、知的障害やてんかんは機能ドメインに関わらず変異が見つかった一方、小脳低形成の患者では遺伝子変異が CaMK, PDZ, SH3 ドメインからしか見つからないことが明らかになった（論文 3 にて発表）。これらのことから、培養細胞系で得られた実験結果は臨床報告を説明できる仮説を提唱できていると考えられた。

2 : XCI の組織解析

X 染色体上の遺伝子である CASK は、女性では X 染色体不活性化の影響を受ける。CASK 異常症の女性患者はヘテロ接合である例がほとんどであることから、女性の体細胞は CASK を発現する細胞と発現しない細胞がモザイク状に混在している状態だと推定される。この細胞のモザイク分布を組織学的に解析するために、図 1 で示した HPRT-GFP マウスを組み合わせ解析した。その結果、CASK ヘテロノックアウトマウスでは、小脳を構成する主要な神経細胞であるプルキンエ細胞と顆粒細胞において、GFP の発現割合がほぼ 100% であることが明らかになった。図 1 で示すように、GFP の発現は CASK 遺伝子の発現と連鎖する。このことから、CASK ヘテロノックアウトマウスでは、プルキンエ細胞および小脳顆粒細胞の生存が CASK 依存的に維持されていることが示唆された（解剖学会・生理学会・薬理学会合同大会にて発表済み、2025年3月、千葉）。

3 : 発達性変化

これまでの実験で、生後 1 から 2 週齢に顆粒細胞密度が低下すること、そして、成獣期には CASK 依存的な細胞の選別が完了していたことから、CASK 依存的な細胞の選別は生後まもなくから成獣になるまでの間の発達イベントだと推察された。小脳形態の発達性変化を解析するために、生後 6 日、13 日、20 日のマウスから小脳組織標本を作成し、それぞれの日齢における GFP 陽性率を解析した（図 5）。小脳皮質からの出力を担うプルキンエ細胞は、生後 6 日齢ですべての細胞が GFP 陽性であった。一方、同じ時期の顆粒細胞については、外顆粒細胞と内顆粒細胞のいずれも GFP 陽性率はおよそ 50% であり、野生型との変化は見られなかった。つぎに、生



後13日齢のマウスをプルキンエ細胞は6日齢と同じく全ての細胞がGFP陽性であったが、顆粒細胞ではおよそ75%の細胞がGFP陽性を示していた。このことから、生後1から2週齢の間にCASK依存的な小脳顆粒細胞の選別が行われていると考えられた。生後20日齢ではGFP陽性率はすでに成獣のそれと同様であったことから、小脳の神経回路が完成する生後3週齢よりまえにCASK遺伝子依存的に小脳顆粒細胞がアポトーシスを介して選別されていると推察された。

CASK遺伝子は全身に広く発現しており、心筋細胞の活動性や腫瘍の増殖に関わっていることが報告されている。特に肝臓の腫瘍ではCASK遺伝子発現が上昇しており、CASKの発現抑制が細胞死を誘発し、腫瘍の形成阻止に効果を示すことが報告されている(Ding et al. Front.

Oncol. 2021)。このことから、CASKは細胞の増殖に影響する、もしくは、細胞死に対して抑制的に作用すると考えられる。この港北ではCASKの欠損がアポトーシス誘導する過程にはCaspaseなどが関与すると報告されている。今後は、すでに確立した培養細胞系を用いて、CASK依存的なアポトーシスの分子メカニズムの解明を進めていきたい。

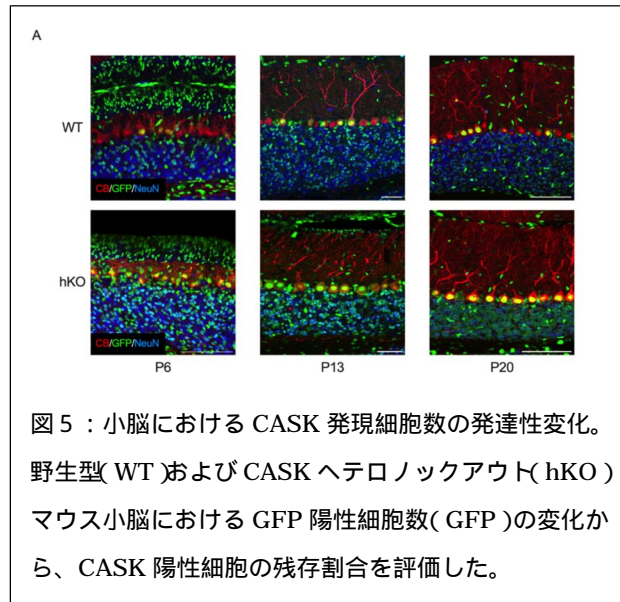


図5：小脳におけるCASK発現細胞数の発達性変化。野生型(WT)およびCASKヘテロノックアウト(hKO)マウス小脳におけるGFP陽性細胞数(GFP)の変化から、CASK陽性細胞の残存割合を評価した。

本報告書で引用した論文成果

1. Q. Guo, E. Kouyama-Suzuki, Y. Shirai, X. Cao, T. Yanagawa, T. Mori and K. Tabuchi. Structural Analysis Implicates CASK-Liprin- α 2 Interaction in Cerebellar Granular Cell Death in MICPCH Syndrome. **Cells**. 12(8), 1177. 2023
2. T. Mori M. Zhou and K. Tabuchi. Diverse pathological phenotypes of CASK-related disorders and multiple functional domains of CASK protein. **Genes**. 14(8), 1656. 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhou Mengyun, Qiu Wen, Ohashi Nobuhiko, Sun Lihao, Wronski Marie-Louis, Kouyama-Suzuki Emi, Shirai Yoshinori, Yanagawa Toru, Mori Takuma, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Deep-Learning-Based Analysis Reveals a Social Behavior Deficit in Mice Exposed Prenatally to Nicotine	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 275 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells13030275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mori Takuma, Zhou Mengyun, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Diverse Clinical Phenotypes of CASK-Related Disorders and Multiple Functional Domains of CASK Protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1656 ~ 1656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14081656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Pang Bo, Mori Takuma, Badawi Moataz, Zhou Mengyun, Guo Qi, Suzuki-Kouyama Emi, Yanagawa Toru, Shirai Yoshinori, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 23
2. 論文標題 An Epilepsy-Associated Mutation of Salt-Inducible Kinase 1 Increases the Susceptibility to Epileptic Seizures and Interferes with Adrenocorticotrophic Hormone Therapy for Infantile Spasms in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7927 ~ 7927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Badawi Moataz, Mori Takuma, Kurihara Taiga, Yoshizawa Takahiro, Nohara Katsuhiko, Kouyama-Suzuki Emi, Yanagawa Toru, Shirai Yoshinori, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Risperidone Mitigates Enhanced Excitatory Neuronal Function and Repetitive Behavior Caused by an ASD-Associated Mutation of SIK1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2021.706494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim Seungjoon, Park Dongseok, Kim Jinhu, Kim Dongwook, Kim Hyeonho, Mori Takuma, Jung Hyeji, Lee Dongsu, Hong Sookkyung, Jeon Jongcheol, Tabuchi Katsuhiko, Cheong Eunji, Kim Jaehoon, Um Ji Won, Ko Jaewon	4. 巻 36
2. 論文標題 Npas4 regulates IQSEC3 expression in hippocampal somatostatin interneurons to mediate anxiety-like behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109417 ~ 109417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mehta Anuradha, Shirai Yoshinori, Kouyama-Suzuki Emi, Zhou Mengyun, Yoshizawa Takahiro, Yanagawa Toru, Mori Takuma, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 IQSEC2 Deficiency Results in Abnormal Social Behaviors Relevant to Autism by Affecting Functions of Neural Circuits in the Medial Prefrontal Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2724 ~ 2724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102724	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 MICPCH症候群治療剤及び治療方法	発明者 田淵 克彦、白井 良 憲、森 琢磨、鈴木 絵美	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-125771	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------